

HERRAMIENTAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

Carrera: Microbiología

Plan de estudios: 2023

Área de Formación: Aplicada

Año: Tercero

Régimen de Cursada: Cuatrimestral

Carácter: Obligatoria

Carga horaria total: 70 horas

Carga horaria teórica: 20 horas

Carga horaria práctica: 50 horas

OBJETIVO GENERAL DEL CURSO

Aportar los contenidos necesarios para realizar las técnicas que permiten el aislamiento, la caracterización y la manipulación de los ácidos nucleicos y su expresión, con el fin de conocer y comprender los fundamentos de las metodologías de ingeniería genética de aplicación en el clonado molecular. Profundizar los conocimientos adquiridos en el curso de Genética General y Microbiana y sentar las bases necesarias para el curso de Ingeniería Genética.

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Se espera contribuir a que el estudiante:

- Adquiera el lenguaje técnico básico de la ingeniería genética mediante su participación en clase y mediante la lectura de la bibliografía específica del curso.
- Desarrolle habilidades teóricas e intelectuales que le permitan construir, apropiarse y aplicar los conocimientos de la clonación molecular a partir de la resolución de las guías de ejercitación práctica.
- Desarrolle habilidades prácticas para la resolución de problemas vinculados con la disciplina en los talleres del curso.
- Analice y comprenda los puntos críticos de cada paso del proceso de clonado molecular y su importancia en el proceso global de obtención de ADN recombinante mediante las prácticas de laboratorio y análisis de trabajos científicos.
- Cuente con las bases para acceder a conocimientos más complejos o especializados en los cursos sucesivos mediante la realización de todos los pasos del proceso de clonado.

CONTENIDOS MÍNIMOS

Introducción a la ingeniería genética: Ácidos nucleicos. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos. Enzimología. Herramientas básicas para el clonado molecular. Vectores de clonado molecular. Sistemas bacterianos empleados en el clonado molecular. Estrategias de obtención y transformación del ADN recombinante. Detección y selección de bacterias transformadas con ADN recombinante. Expresión y purificación de productos recombinantes. Clonado molecular. Expresión proteica.

PROGRAMA ANALÍTICO

MÓDULO 1: INTRODUCCIÓN Y ELEMENTOS DEL CLONADO MOLECULAR

UNIDAD N° I: INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA GENÉTICA: ÁCIDOS NUCLEICOS

Introducción y presentación general a la ingeniería genética: Conceptos básicos y generales. Manipulación de ácidos nucleicos como eje de trabajo. Calidad de los ácidos nucleicos. Densidad óptica. Relación OD 260/280. Fundamentos de la extracción y purificación de ácidos nucleicos. Revisión y comparación de métodos de extracción y métodos de purificación. Cuantificación (espectrofotometría, cualitativa en geles). Métodos de marcado y visualización. Fundamentos de los métodos clásicos de detección de ácidos nucleicos.

UNIDAD N° II: ENZIMOLOGÍA

Enzimas empleadas en el procesamiento y modificación de los ácidos nucleicos. Polimerasas. Síntesis de ácidos nucleicos. Características principales, mecanismo de acción, actividades, usos en biología molecular. Polimerasas de ADN, retrotranscriptasas, polimerasas de ARN, replicasas. Nucleasas. Exonucleasas y endonucleasas. Endonucleasas de restricción: clasificación, sistemas de restricción-modificación, reconocimiento de secuencias dianas, digestión enzimática y tipos de extremos, usos en el proceso de clonado molecular. Ligasas de ADN y de ARN. Mecanismos de acción, cofactores, usos. Ribonucleasas y desoxirribonucleasas (ARNasas y ADNasas). Fosfatasa alcalina. Otras enzimas de importancia en biología molecular. Maduración de los ARNm: Poliadenilato polimerasa y metiltransferasa.

UNIDAD N° III: INTRODUCCIÓN A LAS HERRAMIENTAS BÁSICAS PARA EL CLONADO MOLECULAR

Procedimiento general de clonado molecular, conceptos generales referidos al proceso global: obtención de ADN recombinante, transformación, selección, expresión y purificación. Introducción a las diferentes herramientas y métodos a utilizar en el clonado molecular: proceso de competencia, transformación bacteriana, plaqueo, electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida, Western Blot. Evolución del conocimiento de las técnicas de manipulación genética. Repaso de contenidos de Genética General y Microbiana y otros cursos. Introducción a las bases de datos genéticos y genómicos, relevamiento, usos y aplicaciones.

UNIDAD N° IV: VECTORES DE CLONADO MOLECULAR

Vectores de clonado. Características esenciales de los vectores, tipos, usos, diferencias. Características de los plásmidos. Primera y segunda generación de vectores plasmídicos. Vectores híbridos. Compatibilidad vector-célula huésped. Origen de replicación (sistema de control de replicación y número de copias), genes de resistencia a antibiótico, sitio múltiple de clonado, marcadores seleccionables, tipos de promotores, secuencias de terminación y de unión de ribosomas (RBS). Diferencias entre vectores de clonado y de expresión. Ejemplos de cada uno de ellos. Otros vectores de clonado: fagémidos, cósmidos. Clonación de fragmentos de gran tamaño (cromosomas artificiales- BACs, PACs).

UNIDAD N° V: SISTEMAS BACTERIANOS EMPLEADOS EN EL CLONADO MOLECULAR

Cepas bacterianas. Compatibilidad genotípica. Almacenamiento y preservación: glicerol stock. Competencia bacteriana natural y artificial. Definición y metodología. Competencia química. Electroporación.

MÓDULO 2: ESTRATEGIAS Y PROCEDIMIENTOS DE CLONADO MOLECULAR

UNIDAD N° VI: ESTRATEGIAS DE OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DEL ADN RECOMBINANTE

Procedimientos generales para la generación de ADN recombinante. Obtención de fragmentos/genes por PCR o digestión enzimática. Diseño de primers con sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Herramientas bioinformáticas para el diseño de primers. Compatibilidad de enzimas. Purificación de fragmentos por geles de agarosa. Estrategias de subclonado. Ligación de extremos cohesivos y romos. Requerimientos de los fragmentos para ligación en vectores de clonado y de expresión. Cuantificación de plásmidos y fragmentos de ADN por espectrofotometría o estimación cuantitativa en geles. Relación molar inserto: vector. Ligación. Transformación bacteriana: Fundamentos, definición y metodología. Importancia de los tipos de controles de transformación y viabilidad, selección, evaluación, interpretación. Aplicaciones del clonado molecular en bacterias.

UNIDAD N° VII: DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADAS CON ADN RECOMBINANTE

Detección y análisis de transformantes. Plaqueos, preparación, tipos de cultivo, selección y aislamiento de transformantes. Primera y segunda selección. Sistemas de alfa- complementación. Antibióticos. Inductores/substratos: IPTG-Xgal. Métodos de verificación de transformantes: PCR con primers universales y/o específicos, RFLP, otros. Purificación de plásmidos recombinantes: Lisis alcalina, columnas de intercambio iónico. Métodos de lisis química o enzimática y métodos físicos.

UNIDAD N° VIII: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS RECOMBINANTES

Inducción de la expresión en bacterias. Análisis de la expresión por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western Blot. Controles inducidos y sin inducir. Tags de afinidad: His- tag, GST-tag, MBT-tag. Columnas de afinidad. Exclusión por peso molecular. Precipitación con solventes orgánicos y sales (salting out/salting in). Cuantificación proteica. Producción de moléculas de interés médico, terapéutico y económico: Usos y aplicaciones.

UNIDAD N° IX: TALLER DE CLONADO MOLECULAR

Taller de diseño de estrategias metodológicas para el clonado molecular.

UNIDAD N° X: TALLER DE EXPRESIÓN PROTEICA

Taller de diseño de estrategias metodológicas para el clonado en vectores de expresión.

METODOLOGÍA DE ENSEÑANZA

El curso de Herramientas de Ingeniería Genética está compuesto por APO (Actividad Presencial Obligatoria). Cada APO consiste en material educativo, compuesto por una introducción teórica, una guía de ejercitación (actividad teórico-práctica), y materiales didácticos complementarios, tales como videos explicativos, documentos anexos con el desarrollo en profundidad de algunos de los temas de cada APO. Los contenidos tratados en el curso serán la base para el curso de Ingeniería Genética Aplicada por lo que se tendrá en cuenta la integración de los mismos a partir de los conocimientos adquiridos en cursos previos. El material bibliográfico sugerido, está disponible en el espacio virtual del curso (Moodle). Según la temática de la clase, se presentan consignas que involucran participación activa de los alumnos, mediante búsquedas temáticas, análisis de artículos científicos o elaboración y presentación de un tema en forma grupal.

DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS

Actividades teóricas

Cada APO se inicia con una presentación teórica del tema, con exposición del material educativo específico mediante proyección de diapositivas y uso de la pizarra. Durante la clase teórica, se incentiva a los alumnos a participar a través de preguntas, comentarios o aportes de información relacionada. En forma adicional y según el tema tratado, se brindará material de lectura, tales como artículos científicos, o se solicitará a los alumnos la realización de búsquedas bibliográficas de su interés, en relación con el tema, para analizar en clase.

Actividades prácticas

Cada APO consiste en una introducción teórica y un trabajo práctico. Las actividades prácticas son de dos tipos: 1) guía-cuestionario que cuenta con preguntas y ejercicios de índole práctica para resolver, que podrá ser resuelta a partir de los contenidos abordados en cada teoría, material y bibliografía adicional aportada a los estudiantes; 2) actividad práctica experimental, donde se desarrollará una técnica de laboratorio según el tema de la APO. los alumnos deberán conocer el protocolo y desarrollarlo bajo la supervisión de los docentes. La práctica finaliza con la presentación de un informe estructurado de la actividad y discusión grupal de los resultados.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

La evaluación de los contenidos se realizará mediante un examen parcial en forma presencial y escrita, en la fecha estipulada al inicio del curso (según el calendario académico vigente), coordinada con los demás cursos del cuatrimestre. Se prevé que la misma tenga una duración de 90-120 minutos. La evaluación consiste en una combinación de preguntas de desarrollo relacionadas con los contenidos temáticos teóricos y actividades prácticas discutidos, analizados y desarrollados durante el curso. Se pretende comprobar si el alumno comprendió los conceptos transmitidos, si es capaz de relacionarlos con contenidos de otros cursos y si la información le permite resolver las consignas planteadas en relación a cada tema. También se tendrá en cuenta la comprensión efectiva de las consignas y enunciados, así como la claridad de las respuestas, la capacidad de síntesis, la presencia de respuestas directas y concisas, o de respuestas de temas relacionados que no son del tema que se interroga, como indicador de la comprensión del tópico.

Asimismo, se tendrá en cuenta la participación efectiva durante el curso, mediante la resolución de los ejercicios propuestos en cada APO y el tipo de participación durante las actividades prácticas. El monitoreo del aprendizaje durante las APO se realizará mediante preguntas aleatorias a los estudiantes durante el desarrollo de la clase, y a través de su participación y respuesta en la resolución de las consignas planteadas.

En caso de inasistencia o incumplimiento de la actividad, la recuperación de la APO se realizará hasta una semana antes de la evaluación parcial, en los casos en los que el estudiante no alcance el 75% de cumplimiento de las mismas, pero haya alcanzado el 60%, se ofrecerá una instancia recuperatoria de las APO ausentes (no justificadas) para alcanzar el porcentaje mínimo requerido. La metodología será mediante entrega de la guía-cuestionario y del informe de la actividad de laboratorio.

La calificación de las evaluaciones se hará por el sistema de puntaje de 0 a 10 (cero a diez) puntos, aprobándose con 4 (cuatro) puntos. Finalizado el curso, los alumnos que hayan obtenido calificaciones sea 7 (siete) puntos o superior, reunirán las condiciones para aprobar el curso por promoción.

La nota final del curso se calcula sobre la nota del parcial y el cumplimiento de la presentación de los cuestionarios.

Los alumnos que hayan aprobado con un promedio inferior a 7 (siete) puntos, deberán rendir una EFI en las fechas establecidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Analysis of Genes and Genomes 1st Edition. Richard J. 2004. Reece. ISBN-13: 978-0470843802. ISBN-10: 0470843802. Disponible en la cátedra.
- An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition. Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart. Author Information. New York: W. H. Freeman; 2000. ISBN-10: 0-7167-3520-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21766/>
- Biochemistry, 5th edition. Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer. Author Information. New York: W H Freeman; 2002. ISBN-10: 0-7167-3051-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>
- Biología de los Microorganismos. Edición: 12, Copyright: 2009, ISBN: 9788478291366 (6 ejemplares disponibles en la biblioteca conjunta). https://www.academia.edu/39077515/Biolog%C3%ADa_de_los_microorganismos_BROCK
- Genomes, 2nd edition. Terence A Brown. Oxford: Wiley-Liss; 2002. ISBN-10: 0-471-25046-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/?term=molecular%20biology>
- Human Molecular Genetics. <https://academic.oup.com/hmg>
- Medical Microbiology, 4th edition. Editor: Samuel Baron. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. ISBN-10: 0-9631172-1-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- Microbial Genetics. Maloy, Cronan, Freifelder. 2da edición. ISSN: 0-86720-248-3.1994. Disponible en la cátedra.
- Molecular Biology of the Cell. 4th edition. 2002. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/?term=molecular%20biology>
- Molecular Biology of the Cell 5th ed. B. Alberts, Garland Science, 2008, ISBN-13 978-081534105-5. Disponible en la cátedra.
- Molecular Cell Biology. 4th edition. H. Lodish, et al., ed., W.H. Freeman, 2000, 1184 pp., ISBN-10 0-7167-3706-X. ISBN-13 978-0-7167-3706-3. 1 ejemplar disponible en la biblioteca.
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Michael R. Green, Joseph Sambrook. Second Edition. 1997 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Disponible en la cátedra.
- Molecular genetics of bacteria. Larry Snyder and Wendy Champness. ISSN: 1-55581-102-7. 1997. Disponible en la cátedra
- Técnicas de Ingeniería Genética. M. D. Real García, C. Rausell Segarra, A. Latorre Castillo. Ed. Síntesis. España. 2016. ISBN: 978-84-9171-071-4. Disponible en la cátedra
- The Cell, 2nd edition. A Molecular Approach. Geoffrey M Cooper. Author Information. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>